中国生态农业学报 2017 年 10 月 第 25 卷 第 10 期
Chinese Journal of Eco-Agriculture, Oct. 2017, 25(10): 1444−1455

DOI: 10.13930/j.cnki.cjea.170169

丁梦娇, 黄莺, 李春顺, 宾俊, 李强, 范伟, 张毅, 周冀衡. 植烟土壤中微生物特性及氨化、亚硝化菌分离鉴定与活性研究[J]. 中国生态农业学报, 2017, 25(10): 1444−1455

Ding M J, Huang Y, Li C S, Bin J, Li Q, Fan W, Zhang Y, Zhou J H. Isolation, identification and activity of ammonifiers, nitrosobacteria and microbial characteristics in tobacco-planted soils[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2017, 25(10): 1444−1455

植烟土壤中微生物特性及氨化、亚硝化菌分离鉴定与活性研究*

丁梦娇[1,2], 黄 莺[3], 李春顺[4], 宾 俊[1,2], 李 强[2], 范 伟[1,2], 张 毅[1,2], 周冀衡[1,2]**

(1. 湖南农业大学生物科学技术学院 长沙 410128; 2. 湖南农业大学烟草研究院 长沙 410128; 3. 贵州大学烟草学院 贵阳 550025; 4. 江苏中烟工业有限责任公司原料供应部 南京 210019)

摘 要: 针对烤烟生产中施用有机肥后植烟土壤有机态氮素分解速率不易调控的问题, 并为配制有机氮分解微生物菌剂提供优良菌株, 本研究以化肥、牛粪、玉米秸秆、油枯处理下的烤烟根区土壤为材料, 分离筛选出高活性氨化、亚硝化土著菌, 并分别测定其对有机氮降解及氨氮分解的效果。结果表明: 在烤烟生长旺长期, 施用有机肥处理的土壤可培养细菌、真菌、放线菌、氨化菌数量均高于单施化肥处理; 在烤烟成熟期, 施用有机肥处理, 烤烟根区土壤氨化菌、亚硝化菌、真菌、放线菌数量均高于单施化肥。通过各类菌株的土样来源分析, 氨化作用强度较高的优势菌株均来源于有机肥处理的土样, 植烟土壤施用有机肥较单施化肥能够获得较高活性的氨化细菌。各类菌活性研究显示, 短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)、嗜热脂肪地芽孢杆菌(*Geobacillus stearothermophilus*)、巨大芽孢菌(*B. megaterium*)培养液有机氮含量降幅最大, 较初始有机氮含量分别降低 84.74%、92.74%、79.52%; 寡养单胞菌(*Stenotrophomonas* sp.)兼具有亚硝化作用及硝化作用, 培养 7 d 后, 培养液中硝态氮含量增加了 0.617 mg·L^{-1}; 嗜麦芽寡单胞菌(*S. maltophilia*)亚硝化作用最强, 培养 7 d 后, 培养液中亚硝态氮含量为 0.518 mg·L^{-1}。氨化菌培养 48 h 后有机氮分解速率降低, 具有亚硝化及硝化作用的菌株培养到第 7 d 活性仍处于较高水平。因此, 试验分离出的不同功能细菌在配制解氮复合微生物菌剂时需在不同时间加入菌株进行发酵, 以获得高活性微生物菌剂。根据分解有机氮、解氨试验及相关文献中各菌株作用功能分析, 筛选出纳西杆菌(*Naxibacter* sp.)、寡养单胞菌、短小芽孢杆菌、嗜热脂肪地芽孢杆菌、同温层芽孢杆菌(*B. stratosphericus*)、纤维菌(*Cellulosimicrobium cellulans*)、高地芽孢杆菌(*B. altitudinis*)和巨大芽孢菌 8 株高效氮素功能菌株用于有机氮分解微生物菌剂的配制。

关键词: 植烟土壤; 微生物菌剂; 氨化菌; 亚硝化菌; 分离鉴定; 解氮效果
中图分类号: S154.39 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-3990(2017)10-1444-12

Isolation, identification and activity of ammonifiers, nitrosobacteria and microbial characteristics in tobacco-planted soils*

DING Mengjiao[1,2], HUANG Ying[3], LI Chunshun[4], BIN Jun[1,2], LI Qiang[2],

* 贵州省毕节烟区烟叶产质平衡关键技术优化(201652050024149)和中国烟草云南省公司科技计划项目(2015YN22)资助
** 通讯作者: 周冀衡, 主要从事烟草生理生化研究。E-mail: jhzhou2005@163.com
丁梦娇, 主要从事烟草生理生化与区域生态研究。E-mail: mengjiao1208@163.com
收稿日期: 2017-02-28 接受日期: 2017-06-19
* This study was supported by the Key Technology Optimization of Tobacco Leaf Quality Balance in Bijie, Guizhou Province, China (201652050024149) and China Tobacco Yunnan Province Science and Technology Project (2015YN22).
** Corresponding author, E-mail: jhzhou2005@163.com
Received Feb. 28, 2017; accepted Jun. 19, 2017

FAN Wei[1,2], ZHANG Yi[1,2], ZHOU Jiheng[1,2**]
(1. College of Biological Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. College of Tobacco Research, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 3. Tobacco College of Guizhou University, Guiyang 550025, China; 4. Material Supply Department, Jiangsu Tobacco Industry Limited Liability Company, Nanjing 210019, China)

Abstract: The rate of organic nitrogen decomposition could be not controlled after organic fertilizer application in tobacco-planted soils. This problem could affect the normal growth and quality of tobacco leaves. In this study, chemical fertilizer, cow manure, maize straw and rapeseed cake were applied to the root-zone soil under tobacco. The study attempted to isolate highly active local ammonifiers and nitrosobacteria, and to determine the effects of the two bacteria types on the decomposition of organic nitrogen and ammonia. The study was to make possible the preparation of a microbial agent for the efficient decomposition of organic nitrogen. The results showed that the numbers of bacteria, fungi, actinomycetes and ammonifiers treated with organic fertilizer were higher than those treated with chemical fertilizer during the vigorous growth period of flue-cured tobacco. The numbers of ammonifiers, nitrosobacteria, fungi and actinomycetes treated with organic fertilizer were higher than those treated with chemical fertilizer in flue-cured tobacco at maturity period. Through analysis of soil samples of various strains, the dominant strains with high ammoniation intensity were all derived from soil samples treated with organic fertilizer. It was shown that soils treated with organic fertilizer had higher active ammonifiers than soils treated only with chemical fertilizer. The results showed that decline in organic nitrogen content was highest in *Bacillus pumilus*, *Geobacillus stearothermophilus* and *B. megaterium*, which was 84.74%, 92.74% and 79.52% lower than that of initial organic nitrogen. *Stenotrophomonas* sp. had the highest nitrosation and nitrification activity. After 7 days of culturing, nitrate nitrogen content in cultured medium was 0.617 $mg \cdot L^{-1}$. *S. maltophilia* had the strongest nitrosation activity. After 7 days of culturing, nitrite content in the cultured medium was 0.518 $mg \cdot L^{-1}$. Organic nitrogen decomposition activity of ammoniated bacteria decreased after 48 h of culturing. Then the nitrification and nitrification activities were still high 7 days after culturing. Thus the separation of different functions of bacteria in the preparation of nitrogen-containing composite microbial agents should be done at different times by adding fermentation strain to achieve high activity of microbial agents. In this study, eight strains (*Naxibacter* sp., *Stenotrophomonas* sp., *B. pumilus*, *G. stearothermophilus*, *B. stratosphericus*, *Cellulosimicrobium cellulans*, *B. altitudinis* and *B. megaterium*) were identified as high-efficiency strains of microbial agents for the decomposition of soil organic nitrogen.
Keywords: Tobacco-growing soil; Microbial agents; Ammonifier; Nitrococcus; Isolation and identification; Nitrogen decomposition

烟叶生产中长期大量施用化肥而忽视有机肥的施用会造成土壤腐殖质含量降低、生物活性差，土壤贫瘠化程度越来越严重，单纯施用优质化肥调节土壤营养也难以弥补因土壤贫瘠造成的营养失衡，造成烟叶工业可用性不高，烟碱、淀粉含量偏高，结构紧密，香气量不足，香气质变差甚至风格丧失，严重制约了烟草(*Nicotiana tabacum*)生产的可持续发展[1]。现代烟草农业正逐渐向绿色烟草、生态烟草发展，人们对烟草及烟草制品也提出了更高的安全性要求。减少化肥在烟草生产中的施用量，增施有机肥，对改善土壤理化性状，增加土壤肥力，提高烟叶品质和安全性，促进烟草生产的可持续发展具有重要的意义[2]。但有机肥养分的分解和释放受多种环境因子的制约，其有效性难以预测和控制，尤其是当氮素施用时期与烤烟的需氮规律不吻合，用量过大时烟株表现为团棵慢，旺长与成熟推迟，影响烤烟的产量和品质[3]。贵州植烟土壤一般比较黏重，烤烟生长前期低温多雨，施用有机肥后土壤氮素的生物有效性不高，氮素供不应求，难于满足烤烟前期生长的需要[4]。土壤微生物的活动对烟地土壤氮素的转化、供应和生物有效性起决定作用[5]。以往研究多集中于烟田施用有机肥后土壤微生物活性、理化指标的变化[6-10]及微生物菌肥对烤烟的生产效应[2]，并较少涉及结合当地生态环境生产解氮微生物菌肥来调控植烟土壤中有机氮的分解，进而解决施用有机肥后有效态氮素在烤烟生长期后移的问题。调控有机态氮素的分解速率，氨化细菌、亚硝化细菌、硝化细菌起决定作用，有机氮分解菌多分离于废水、应用于废水处理中[11-13]，从土壤中分离纯化应用的研究鲜见报道。不同生境的植物根区生存着不同的菌株，而不同菌株对环境的适应性不同[14]，且土著菌的应用不会对环境造成二次污染。因此本研究在全面了解烤烟生长期各类菌活性变化的基础上，从氮素循环微生物生理群角度出发，以不同类型有机肥处理下的植烟根区土壤为材料，分离筛选高活性氨化、亚硝化土著菌，并分别测定其对有机

氮降解及铵态氮分解的效果，为生产出适合当地生境调节土壤中有机肥氮素分解的复合微生物菌剂奠定基础。

1 材料与方法

1.1 添施有机肥植烟黄壤的微生物特性及氨化、亚硝化菌筛选鉴定

1.1.1 供试材料

试验在贵州省安顺市平坝县龙山村贵州大学烟草基地进行(26°37′N, 106°54′E)，地处亚热带季风气候区，平均海拔 1 898 m，年平均气温 17.2 ℃。试验地土壤为黄壤，质地为壤土，有机质 46.79 $g\cdot kg^{-1}$，全氮 1.79 $g\cdot kg^{-1}$，铵态氮 9.42 $mg\cdot kg^{-1}$，硝态氮 5.71 $mg\cdot kg^{-1}$，容重 1.20 $g\cdot cm^{-1}$，pH 5.37，全磷 1.08 $g\cdot kg^{-1}$，有效磷 17.78 $mg\cdot kg^{-1}$，全钾 9.63 $g\cdot kg^{-1}$，速效钾 207.60 $mg\cdot kg^{-1}$[15]。

供试烤烟品种为‘K326’。供试肥料为烟草专用复合肥($N∶P_2O_5∶K_2O$=10∶11∶23)、牛粪、秸秆、油枯。其中各有机肥均经过腐熟处理，营养结构相对稳定。各有机肥成分特征如表 1 所示。

表 1 供试有机肥的养分含量

Table 1 Nutrients contents of the selected organic fertilizers $g\cdot kg^{-1}$

有机肥 Organic fertilizer	有机质 Organic matter	全氮 Total nitrogen	全磷 Total phosphorus	全钾 Total potassium
牛粪 Cow manure	45.77	12.91	3.52	6.63
秸秆 Straw	80.36	11.14	2.59	6.78
油枯 Rapeseed cake	52.21	30.23	14.21	6.42

1.1.2 试验设计

试验采用完全随机设计，共 4 个处理，分别为：复合肥 1 500 $kg\cdot hm^{-2}$(对照)、复合肥 1 200 $kg\cdot hm^{-2}$+牛粪 2 326 $kg\cdot hm^{-2}$、复合肥 1 200 $kg\cdot hm^{-2}$+秸秆 2 703 $kg\cdot hm^{-2}$、复合肥 1 200 $kg\cdot hm^{-2}$+油枯 993 $kg\cdot hm^{-2}$。

每个处理 3 次重复，共 12 个小区，小区面积 33.6 m^2，种植密度 0.65 m(株距)×0.90 m(行距)。小区之间留 1 m 间隔，试验地外四周各留 2 m 保护行。按纯氮量为 150 $kg\cdot hm^{-2}$ 施肥，施用时保证不同处理中有机肥用量的含氮量相同，均为总氮量的 20%，有机肥全部用作基肥。烤烟移栽 30 d 追肥，为烟草专用复合肥($N∶P_2O_5∶K_2O$=13∶0∶26)，施用量 1 000 $kg\cdot hm^{-2}$。

1.1.3 取样

根据土壤养分变化规律及烟草生长周期，于烤烟移栽后 60 d 和 90 d(分别为烤烟旺长期及成熟期)取样。

取样时避开施肥部位，以烟秆为中心在距烟株 10 cm 处呈辐射状取 4~6 点土样，取土深度 5~20 cm。每小区选取 3 株健壮无病的烤烟根区土壤混合为供试样品，装入无菌采样袋中包扎密封低温运输至实验室立即进行菌株分离。

1.1.4 培养基种类

蛋白胨琼脂培养基用于氨化菌的计数及分离纯化[16]，改良的斯蒂芬森(Stephenson)培养基用于亚硝化菌的计数及分离纯化[17]，牛肉膏蛋白胨液体培养基用于细菌计数、氨化菌的特性研究及氨化作用强度测定[18]，LB 液体培养基用于菌种的活化与富集培养[19]，马丁氏(Martin)培养基用于真菌计数[3]，铃薯-蔗糖琼脂(PDA)培养基用于放线菌计数[18]，生孢培养基用于鉴定是否产生芽孢[18]。

1.1.5 各类菌的数量测定

倍比稀释后，氨化菌数量采用 10^{-4}、10^{-5} 梯度，蛋白胨琼脂培养基，MPN 法测定；亚硝化菌数量采用 10^{-3}、10^{-4} 梯度，改良的斯蒂芬森(Stephenson)培养基，MPN 法测定；细菌数量采用 10^{-4}、10^{-5} 梯度，牛肉膏蛋白胨培养基，涂布平板法测定；真菌数量采用 10^{-2}、10^{-3} 梯度，马丁氏(Martin)培养基，涂布平板法测定；放线菌采用 10^{-2}、10^{-3} 梯度，铃薯-蔗糖琼脂(PDA)培养基，涂布平板法测定[18]。

1.1.6 氨化菌、亚硝化菌的分离、纯化和分类鉴定

通过稀释平板法接种后的平皿倒置于恒温培养箱中培养，根据菌落数量、形态、颜色、表面状况及染色特征，选取有代表性的菌落用无菌接种环将单个菌落挑出，同时按照无菌操作要求在相应的固体培养基上划线培养直至纯化。纯化出的菌株需进行初步检测是否为想分离的菌种。1)氨化细菌的初步检测：将单菌落加入到牛肉膏蛋白胨培养液中，每株菌 3 次重复，培养 2 d 后，吸取少量培养液在白瓷比色板中，滴加奈氏试剂若出现红棕色或黄色沉淀证明培养液中有氨化细菌将蛋白胨分解后产生 NH_3，由此现象初步确定所分离的为氨化细菌。2)异养亚硝化细菌的初步检测：将纯化出的菌落接种至 Stephenson 培养液中，3 次重复，培养 14 d 后，吸取两滴培养物置白瓷比色板上，滴加格利斯试剂Ⅰ，Ⅱ各两滴，出现红色反应证明 NO_2^-的产生，有亚硝化细菌存在。另取 2 滴培养物于白瓷比色板上，加 2 滴二苯胺试剂，出现蓝色反应，证明 NO_3^-的产生，有硝化细菌存在。以不加菌培养液为对照。

菌株形态观察：平板培养、革兰氏染色、生孢鉴定。

生理生化试验：甲基红试验、淀粉水解、V-P 试验、D-葡萄糖产酸、葡萄糖产气、硝酸盐还原、接触酶试验、柠檬酸盐利用、D-甘露醇、明胶水解、尿素水解试验、吲哚产生试验、氧化酶试验、苯丙氨酸脱氨酶[18]。

16S rDNA 分子生物学鉴定：1492r/27f 的 PCR 扩增和序列测定。先根据细菌 DNA 试剂盒要求的步骤提取出 PCR 反应 DNA 模板，利用细菌核糖体基因转录间隔区(16S rRNA)通用引物 27f(5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′)和 1492r(5′-GGTTACCTTGTTACGACTT-3′)对降解菌的 rDNA- 27f/1492r 区进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(25 μL)：ddH$_2$O 9.5 μL、2×Taq Master Mix 12.5 μL、Forward Primer (10 pmol·μL^{-1}) 1 μL, Reverse Primer (10 pmol·μL^{-1}) 1 μL, DNA 模板 1 μL。PCR 扩增条件为：95 ℃预变性 5 min；94 ℃变性 1 min, 50~52 ℃退火 1 min, 72 ℃延伸 2 min，共 35 个循环；最终 72 ℃充分延伸 5 min, 4 ℃冰箱保存。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测后，上海恒因基因组研究中心有限公司进行测序，测序结果在 GenBank 数据库(www.ncbi.nlm.nih.gov)中进行 BLAST 比对分析。

1.2　菌株分解有机氮和解铵试验

1.2.1　供试材料

上述初筛分离所获各类氨化菌共 15 株，亚硝化菌 5 株。

牛肉膏蛋白胨液体培养基、LB 培养基和改良的斯蒂芬森液体培养基。

1.2.2　试验设计

1)将分离鉴定后的氨化菌、亚硝化菌分别接种 LB 液体培养基中活化，适温培养 12 h。

2)将活化的氨化、亚硝化菌菌液按 4%接种量接入 150 mL 的牛肉膏蛋白胨液体培养基中，每株菌设 3 个重复。于恒温摇床(130 r·min^{-1}, 30 ℃)按分离条件进行培养。培养后 0 h、12 h、24 h、48 h 和 72 h 取样，测定各菌株培养液的凯氏氮、有机氮、氨态氮含量。

3)将活化的亚硝化菌菌液按 4%接种量接入 150 mL 改良的斯蒂芬森液体培养基中，每株菌设 3 个重复。于恒温摇床(130 r·min^{-1}, 30 ℃)按分离条件进行培养。培养后 0 d、1 d、3 d、5 d 和 7 d 取样，测定各菌株培养液的硝态氮、亚硝态氮含量。

氨态氮测定采用滴定法，有机氮含量=凯氏氮含量−氨氮含量，硝态氮测定采用酚二磺酸光度法，亚硝态氮测定采用 N-(1-奈基)-乙二胺光度法[20]。

2　结果与分析

2.1　不同类型有机肥对植烟黄壤微生物特性的影响

2.1.1　烤烟根区土壤各类菌数量变化

从表 2 可以看出，除牛粪处理中真菌数量、化肥处理中放线菌数量 90 d 高于 60 d，其他处理各类菌的数量均是在烤烟生长旺长期高于成熟期，可能因为旺长期土壤养分丰富，促进了各类菌的生长。施用有机肥或有机无机肥配施能够通过调节土壤理化性质提高土壤微生物数量，微生物活性增强有利于有机肥中速效养分的释放[6-7,21]。烤烟移栽 60 d，施用有机肥处理各类菌数量基本高于单施化肥，施用秸秆、油枯处理的土壤中可培养细菌、真菌、放线菌数量较单施化肥处理达显著水平。烤烟移栽 90 d，施用有机肥亚硝化菌、真菌数量显著高于单施化肥，细菌、放线菌数量高于化肥处理。土壤中硝化细菌数量只测定参与硝化作用第 1 阶段的亚硝酸细菌，即能反映硝化细菌数量的多寡[17]。烤烟主要吸收硝态氮，亚硝化菌促进铵态氮向亚硝态氮转化，进而完成硝化作用，生成硝态氮。烤烟成熟期施用牛粪、秸秆、油枯有机肥处理亚硝化菌数量分别显著高于单施化肥处理 101.75%、104.39%、55.26%，说明施用有机肥处理在烤烟成熟期根区土壤亚硝化菌活性较高；研究表明，较高的亚硝化菌活性促进有机肥中有效态氮素的释放，土壤中铵态氮、硝态氮含量在烤烟采烤期水平较高，不利于烤烟适时落黄，容易出现烤烟上部叶烟碱含量高、可用性差等问题[7,21-22]。真菌是土壤生态结构重要组成部分，是环境中重要的分解者，参与动、植物残体的分解，是土壤中碳、氮循环不可缺少的动力，有益真菌中 AM 真菌与植物共生形成菌根菌，能够促进养分的吸收[23-25]；烤烟成熟期，施用有机肥处理根区土壤真菌活性较高，从而促进烟株对土壤中速效养分的吸收，可能会不利于保持烤烟较低的氮素水平。

2.1.2　植烟黄壤分离的菌株特性

根据纳氏试剂显色、格里斯试剂显色及二苯胺试剂显色法，挑选出深黄色、橘黄色氨化菌株 11 株；粉色、红色及蓝色亚硝化、硝化菌株 5 株，分别为 A-4、A-6、A-8、A-17、X-4。对 15 个菌株分别进行单菌落培养、革兰氏染色以及生理生化试验。通过表面特征、产孢培养、革兰氏染色以及查阅《伯杰细菌鉴定手册》[26]、《常见细菌系统鉴定手册》[27]初步模糊确定各菌株的属。其中 A-9、A-11、A-12、

表 2 施用不同有机肥烤烟根区土壤微生物数量变化

Table 2 Changes of various types of microbials in the root zone soil of tobacco after applying different organic fertilizers

微生物 Microbial	培养时间 Incubation time (d)	化肥 Chemical fertilizer	牛粪 Cow manure	秸秆 Straw	油枯 Rapeseed cake
氨化菌 Ammonifiers ($\times10^6$ cfu·g^{-1})	60	2.65±0.32a	3.33±0.24a	2.9±0.34a	2.87±0.48a
	90	2.22±0.29a	2.51±0.02a	2.73±0.34a	2.51±0.11a
亚硝化菌 Nitrosobacteria ($\times10^5$ cfu·g^{-1})	60	2.44±0.14a	3.23±0.38a	3.12±0.24a	2.28±0.54a
	90	1.14±0.04c	2.30±0.33a	2.33±0.37a	1.77±0.28b
细菌 Bacteria ($\times10^6$ cfu·g^{-1})	60	7.33±0.77b	11.00±1.01ab	14.00±0.83a	15.00±0.84a
	90	3.00±0.03b	6.00±0.34a	2.33±0.17b	3.33±0.04b
真菌 Fung ($\times10^4$ cfu·g^{-1})	60	5.00±0.08b	8.33±0.07ab	12.33±0.06a	13.67±0.08a
	90	2.33±0.05b	10.00±0.08a	4.67±0.11b	9.00±0.06a
放线菌 Actinomycetes ($\times10^4$ cfu·g^{-1})	60	5.67±0.05b	15.33±1.14a	12.67±0.38a	15.33±0.35a
	90	8.67±0.38a	9.33±0.38a	9.67±0.33a	9.33±0.28a

不同小写字母表示同一培养时间不同处理间差异显著($P<0.05$)。Different lowercase letters indicate significant differences among different fertilizers at the same incubation time at 0.05 level.

A-19、A-36 通过产孢培养生成芽孢、革兰氏染色阳性、接触酶阳性等反应，初步确定为芽孢杆菌属(*Bacillus*)。A-4、A-8 细菌涂片革兰染色镜下为短至中等大小的革兰氏阴性杆菌，不染色标本显微镜下动力检查运动活跃，氧化酶阴性，葡萄糖氧化分解缓慢，能液化明胶，硝酸盐产氮气阴性，初步确定为寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)。其他菌株暂无法确定属性。由表 3 可知，从化肥处理的烟株根区土壤中只分离得到 3 株菌，其余菌株均是从有机肥处理的根区土壤中分离获得。

2.1.3 植烟黄壤分离的氨化菌、亚硝化菌 16S rDNA 鉴定

综合生化试验结果(表 4)和分子鉴定结果(表 5)，发现本研究中所分离的菌株形态及生化鉴定结果和分子鉴定结果能很好地吻合，说明本研究的鉴定结果准确可靠。鉴定结果表明，A-9、A-11、A-12、A-19、A-36 分别为不同种的芽孢杆菌属，来源都为不同类型的有机肥，A-4、A-8 均属于寡养单胞菌属，A-2、A-10 为表型相近两种基因型的洋葱伯克霍尔德菌属(*Burkholderia*)，A-5 为黄杆菌属(*Flavobacterium*)。

2.2 各菌株培养液中氮素含量变化动态及亚硝化菌分解氨氮试验

2.2.1 各菌株培养液中氮素含量变化动态

凯氏氮包括氨氮和在此条件下能被转化为铵盐而测定的有机氮化合物，此类有机氮化合物主要是指蛋白质、氨基酸、核酸、尿素以及大量合成的、氮为负三价态的有机氮化合物，它不包括叠氮化合物、联氮、偶氮、腙、硝酸盐、亚硝酸盐、腈、硝基、亚硝基、肟和半卡巴腙类的含氮化合物[20]。由表 6 可以看出，培养 72 h 以后，各菌株培养液中凯氏氮含量都有不同程度的降低，一方面原因是菌株自身生长需要大量的氮素，另一方面氮素转化菌不仅通过氨化作用将有机态氮素转化成 NH_4^+-N，而且不同的菌株可能会进行各自的代谢、生理生化反应，生成除凯氏氮以外的其他形态的氮素。15 株菌中，除 A-19 菌株培养液，A-9、A-11、A-36 菌株培养液凯氏氮减少量均显著高于其他菌株培养液，这 3 株菌培养 72 h 后培养液中凯氏氮含量较初始凯氏氮含量减少率分别为 56.84%、64.66%、55.46%。不同菌株生长速率及活性各有差异，通过查找表 6 可以看出，凯氏氮减量高的菌株芽孢杆菌属居多，其中 A-12(同温层芽孢杆菌)、A-36(巨大芽孢杆菌)在培养 12 h 时凯氏氮含量就有较大幅度降低，A-11(嗜热脂肪地芽孢杆菌)降幅最大，A-8(寡养单胞菌)降幅最小。

在测定凯氏氮和氨氮后，其差值即为有机氮[20]。由于本试验只用了有机态氮素的培养基，若有高效氨化菌的存在只能进行有机态氮素分解的第一步，即氨化作用，释放出的除培养液中的氨氮，还包括释放到外界的氨气，因此有机氮含量只计算凯氏氮减去氨氮的部分。有机态氮素变化趋势与凯氏氮变化趋势相一致。A-9(短小芽孢杆菌)、A-11(嗜热脂肪地芽孢杆菌)、A-36(巨大芽孢杆菌)有机氮含量降幅最大，较初始有机氮含量分别降低 84.74%、92.74%、79.52%。其中巨大芽孢杆菌在培养后 12 h、48 h 有机氮含量有较大降幅，较前一时期降幅分别为 20.86%、44.17%, 48 h 以后有机氮含量降低较少，可

表 3　不同有机肥处理下植烟黄壤中分离的菌株表型特征及革兰氏染色结果

Table 3　Colony morphologies and gram staining of strains of microbials isolated from tobacco soil under different organic fertilizers treatments

菌株号 Strain	处理 Treatment	大小 Size	颜色 Colour	形状 Shape	边缘 Edge	表面状况 Surface condition	隆起度 Uplift	生长速度 Growth rate	革兰氏染色 Gram stain
A-2	化肥 Chemical fertilizer	大 Big	乳白色 Lvory white	圆形 Circular	光滑整齐 Smooth and regular	湿润 Moist	凸起 Convex	快 Fast	G^-
A-4	牛粪 Cow manure	较大 More bigger	浅黄色 Light yellow	圆形 Circular	光滑整齐 Smooth and regular	较湿润 More moist	凸起 Convex	快 Fast	G^-
A-5	油枯 Rapeseed cake	小 Small	黄色 Yellow	近圆形 Suborbicular	光滑整齐 Smooth and regular	湿润 Moist	扁平 Flat	快 Fast	G^-
A-6	秸秆 Straw	大 Big	乳白色 Lvory white	圆形 Circular	光滑整齐 Smooth and regular	湿润 Moist	扁平 Flat	快 Fast	G^-
A-8	油枯 Rapeseed cake	较大 More bigger	黄色 Yellow	圆形 Circular	光滑整齐 Smooth and regular	较湿润 More moist	凸起 Convex	快 Fast	G^-
A-9	牛粪 Cow manure	较小 Less smaller	乳白色 Lvory white	圆形 Circular	光滑整齐 Smooth and regular	较湿润 More moist	凸起 Convex	快 Fast	G^+
A-10	化肥 Chemical fertilizers	大 Big	乳白色 Lvory white	圆形 Circular	光滑整齐 Smooth and regular	湿润 Moist	凸起 Convex	快 Fast	G^-
A-11	油枯 Rapeseed cake	较小 Less smaller	灰白色 Off white	圆形 Circular	光滑齿状 Smooth and toothed	湿润 Moist	扁平 Flat	快 Fast	G^+
A-12	牛粪 Cow manure	大 Big	乳白色 Lvory white	圆形 Circular	光滑整齐 Smooth and regular	较湿润 More moist	凸起 Convex	快 Fast	G^+
A-17	秸秆 Straw	小 Small	浅黄色 Light yellow	圆形 Circular	光滑整齐 Smooth and regular	较湿润 More moist	凸起 Convex	慢 Slow	G^+
A-19	油枯 Rapeseed cake	大 Big	浅黄色 Light yellow	圆形 Circular	光滑整齐 Smooth and regular	较湿润 More moist	凸起 Convex	快 Fast	G^+
A-36	牛粪 Cow manure	较大 More bigger	乳白色 Lvory white	圆形 Circular	光滑齿状 Smooth and toothed	较湿润 More moist	凸起 Convex	快 Fast	G^+
X-1	化肥 Chemical fertilizers	较小 Less smaller	乳白色 Lvory white	圆形 Circular	光滑整齐 Smooth and regular	湿润 Moist	凸起 Convex	快 Fast	G^-
X-3	牛粪 Cow manure	较小 Less smaller	黄色 Yellow	近圆形 Suborbicular	光滑齿状 Smooth and toothed	干燥 Dry	凸起 Convex	慢 Slow	G^+
X-4	秸秆 Straw	较大 More bigger	浅粉色 Pale pink	近圆形 Suborbicular	光滑整齐 Smooth and regular	干燥 Dry	凸起 Convex	慢 Slow	G^+

革兰氏染色法中, G^+表示阳性、G^-表示阴性。G^+ means positive and G^- means negative in Gram staining method.

表 4　不同有机肥处理下植烟黄壤中分离的菌株生理生化反应结果

Table 4　Physio-biochemical characteristics of strans of microbials isolated from tobacco soil under different organic fertilizers treatments

菌株号 Strain	接触酶 Enzyme	V-PV-P test	*D*-葡萄糖产酸 *D*-glucose produce acid	葡萄糖产气 Glucose gas	淀粉水解 Amylolysis	明胶水解 Gelatin hydrolysis	柠檬酸盐利用 Citrate utilization	吲哚产生 Indole produce
A-2	+	–	+	–	–	+	+	+
A-4	+	–	+	–	–	+	–	–
A-5	+	–	–	+	–	–	–	+
A-6	+	–	+	–	+	+	–	–
A-8	+	–	–	–	–	+	–	–
A-9	+	+	+	–	–	+	+	–
A-10	+	–	+	–	–	+	+	+
A-11	+	–	+	–	+	+	+	–
A-12	+	–	+	–	+	+	+	–
A-17	+	–	+	–	+	+	+	–
A-19	+	–	+	–	+	+	+	–
A-36	+	–	+	–	+	+	+	–
X-1	+	+	+	+	+	–	+	–
X-3	+	+	+	+	+	+	+	–
X-4	+	+	+	+	+	+	+	–

表 4 续表

菌株号 Strain	*D*-甘露醇 *D*-mannitol	氧化酶 Oxidase	苯丙氨酸脱氨酶 Phenylalanine deaminase	甲基红 Methyl red	尿素水解 Urea hydrolysis	生成芽孢 Generating spore	硝酸盐还原 Nitrate reduction
A-2	+	+	–	–	+	–	–
A-4	–	–	–	–	+	–	–
A-5	–	–	–	+	+	–	+
A-6	+	–	–	–	–	–	–
A-8	–	–	–	–	+	–	–
A-9	+	+	–	–	+	+	+
A-10	+	+	–	–	+	–	–
A-11	+	+	–	–	+	+	+
A-12	+	+	–	–	+	+	+
A-17	+	–	+	–	+	–	+
A-19	+	+	–	–	+	+	+
A-36	+	+	+	–	+	+	+
X-1	+	–	–	–	–	–	+
X-3	+	+	+	–	+	–	+
X-4	+	+	+	–	+	–	+

表 **5** 不同有机肥处理下植烟黄壤中分离的菌株 16s-DNA 测试结果

Table 5 16s-DNA test results of microbials isolated from tobacco soil under different organic fertilizers treatments

菌株号 Strain	名称 Name	序列 Sequence	查询覆盖 Query coverage (%)	同源性 Homology (%)
A-2	*Burkholderia stabilis* 稳定伯克霍尔德菌	JX010989	100	100
A-4	*Stenotrophomonas maltophilia* 嗜麦芽寡单胞菌	KC764984	100	99
A-5	*Flavobacterium* sp. 黄杆菌属	KM391413	100	99
	Flavobacterium frigidimaris	JX971564	99	99
A-6	*Naxibacter* sp. 纳西杆菌属	GQ354568	99	98
A-8	*Stenotrophomonas* sp. 寡养单胞菌	KJ482859	99	100
	Stenotrophomonas rhizophila 嗜根寡养单胞菌	KJ748607	99	100
A-9	*Bacillus pumilus* 短小芽孢杆菌	LC034563	100	100
A-10	*Burkholderia cepacia* 洋葱伯克霍尔德菌	AY741346	100	99
A-11	*Geobacillus stearothermophilus* 嗜热脂肪地芽孢杆菌	KM226938	100	100
A-12	*Bacillus stratosphericus* 同温层芽孢杆菌	KF973238	100	100
A-17	*Cellulosimicrobium cellulans* 纤维菌	GQ496666	100	99
	Cellulosimicrobium funkei 纤维素微菌	JN993996	99	99
A-19	*Bacillus altitudinis* 高地芽孢杆菌	KM374744	100	100
A-36	*Bacillus megaterium* 巨大芽孢杆菌	CP009920	100	100
X-1	*Enterobacter aerogenes* 产气肠杆菌	KJ631293	100	100
X-3	*Streptomyces phaeochromogenes* 链霉菌	FJ481064	100	99
X-4	*Streptomyces fradiae* 弗氏链霉菌	AB184253	100	99

能是培养 2 d 后细菌逐渐进入成熟期，菌量增加幅度降低、活性减弱所致。

各菌株在牛肉膏蛋白胨液体培养基中培养过程中，除 A-4(嗜麦芽寡单胞菌)、A-6(好氧性纳西杆菌)、A-8(寡养单胞菌)、A-17(纤维素微菌)、X-4(弗氏链霉菌)外，其他菌株培养液中氨氮含量呈直线上升的趋势，其中 A-9(短小芽孢杆菌)、A-11(嗜热脂肪地芽孢杆菌)升幅最高，较其他菌株氨氮增量有显著性差异，其次为 A-19(高地芽孢杆菌)及 A-36(巨大芽孢杆菌)；分析以上 5 株菌氨氮增量小的原因可能是

表 6　筛选出的菌株不同培养时间培养液中凯氏氮、有机氮、氨氮含量变化动态

Table 6　Dynamics of Kjeldahl nitrogen, organic nitrogen, ammonia levels in culture solutions of isolated strains in different incubation times

mg·L^{-1}

氮素类型 Nitrogen type	菌株号 Strain	培养时间 Incubation time (h)					变化量 Changing quantity
		0	12	24	48	72	
凯氏氮 Kjeldahl nitrogen	A-2	1 179.60	1 107.72	1 022.87	1 002.67	982.67	196.93±12.27de
	A-4	1 179.60	1 056.45	1 035.45	1 005.34	998.76	180.84±30.45de
	A-5	1 179.60	1 156.85	1 146.76	1 140.04	990.55	189.05±30.99de
	A-6	1 179.60	1 114.99	1 115.89	1 052.71	1 039.24	140.36±22.60de
	A-8	1 179.60	1 176.22	1 138.36	1 115.66	1 078.69	100.91±15.41e
	A-9	1 179.60	1 169.67	1 158.67	933.98	509.08	670.52±40.79a
	A-10	1 179.60	1 137.72	1 022.87	962.67	957.33	222.27±25.24d
	A-11	1 179.60	1 081.46	1 013.12	773.69	416.83	762.77±40.41a
	A-12	1 179.60	922.54	902.54	866.22	828.27	351.33±30.55c
	A-17	1 179.60	1 143.61	1 133.51	1 080.45	1 064.83	114.77±14.48e
	A-19	1 179.60	1 127.25	990.89	849.14	672.04	507.56±24.66b
	A-36	1 179.60	977.76	897.35	609.46	525.44	654.16±31.11a
	X-1	1 179.60	1 168.13	1 146.33	1 088.33	998.55	181.05±18.24de
	X-3	1 179.60	1 144.22	1 136.98	1 011.45	908.67	270.93±14.36cd
	X-4	1 179.60	1 075.39	1 035.45	1 005.67	998.67	180.93±4.99de
有机氮 Organic nitrogen	A-2	1 177.38	1 080.50	833.76	815.86	746.14	431.24±25.89de
	A-4	1 177.38	968.62	944.39	910.45	913.54	263.84±21.99fg
	A-5	1 177.38	1 148.84	1 061.04	976.82	777.07	400.31±30.35de
	A-6	1 177.38	1 110.76	1 110.60	1 045.70	1 032.35	145.03±12.93g
	A-8	1 177.38	1 172.90	1 131.95	1 105.13	1 075.32	102.06±5.57g
	A-9	1 177.38	990.46	877.54	609.20	179.65	997.73±22.69ab
	A-10	1 177.38	1 031.91	828.73	727.12	716.86	460.52±28.26d
	A-11	1 177.38	952.02	783.80	464.22	85.44	1 091.94±67.83a
	A-12	1 177.38	916.81	805.05	647.51	575.16	602.22±45.61c
	A-17	1 177.38	1 140.60	1 130.23	1 073.79	1 058.47	118.91±14.08g
	A-19	1 177.38	1 023.63	793.18	605.76	406.63	770.75±24.08b
	A-36	1 177.38	931.73	810.79	452.64	241.11	936.27±27.26ab
	X-1	1 177.38	1 162.93	1 086.42	944.56	834.28	343.10±26.55ef
	X-3	1 177.38	1 010.01	937.36	779.02	658.38	519.00±25.58cd
	X-4	1 177.38	944.66	891.86	852.58	855.05	322.33±20.38ef
氨氮 Ammonia	A-2	2.22	27.22	189.11	186.81	236.53	234.31±17.84bc
	A-4	2.22	87.83	91.06	94.89	85.22	83.00±8.55e
	A-5	2.22	8.01	85.72	163.22	213.48	211.26±19.91c
	A-6	2.22	4.23	5.29	7.01	6.89	4.67±0.34f
	A-8	2.22	3.32	6.41	10.53	3.37	1.15±0.16f
	A-9	2.22	179.21	281.13	324.78	329.43	327.21±14.59a
	A-10	2.22	105.81	194.14	235.55	240.47	238.25±19.61bc
	A-11	2.22	129.44	229.32	309.47	331.39	329.17±15.03a
	A-12	2.22	5.73	97.49	218.71	253.11	250.89±15.01bc
	A-17	2.22	3.01	3.28	6.66	6.36	4.14±0.46f
	A-19	2.22	103.62	197.71	243.38	265.41	263.19±17.61b
	A-36	2.22	46.03	86.56	156.82	284.33	282.11±21.11b
	X-1	2.22	5.20	59.91	143.77	164.27	162.05±14.72d
	X-3	2.22	134.21	199.62	232.43	250.29	248.07±20.44bc
	X-4	2.22	130.73	143.59	153.09	143.62	141.40±17.37d

变化量为培养结束与初始培养液中氮素含量相差绝对值。Change quantity is absolute difference between the values of initial and ending solutions.

菌的氨化作用强度低，或培养液中的氨氮被有亚硝化作用的菌分解，尤其从 48 h 到 72 h 时期，培养液中氨氮含量有降低趋势，也说明 48 h 以后这 5 株菌对有机氮分解速率降低，这与凯氏氮、有机氮降低速率及幅度相一致，A-6、A-8、A-17 菌降幅最小。A-4、A-6、A-8、A-17、X-4 菌株通过格里斯试剂、二苯胺试剂有红色或红色、蓝色显色反应，可能有亚硝化、硝化作用，需进一步验证。各菌株培养液中定氮仪消煮滴定法测定的氨氮含量增加趋势与凯氏氮、有机氮降低趋势相符，测定方法简便，因此通过此方法只测定氨氮的增量也可以初步判断氨化菌的活性。

2.2.2 亚硝化菌、硝化菌培养液亚硝态氮、硝态氮含量变化动态

由表 7 可以看出，A-8(寡养单胞菌)不仅能通过亚硝化作用将培养液中铵态氮转化成亚硝态氮，而且具有硝化作用，能将亚硝态氮转化成硝态氮。A-4(嗜麦芽寡单胞菌)、A-6(好氧性纳西杆菌)、A-17(嗜麦芽寡单胞菌)、A-6(好氧性纳西杆菌)、X-4(弗氏链霉菌)菌株只有亚硝化作用，在以 NH_4^+-N 为唯一氮源的培养基中能够将 NH_4^+-N 转化成 NO_2^--N，培养 1 周时具有亚硝化作用的菌株活性大小为 A-4>A-17>A-6>X-4。具有亚硝化作用及硝化作用的菌株生长较慢，培养到第 7 d 活性仍处于较高水平。

表 7 筛选出的亚硝化菌和硝化菌培养液中亚硝态氮和硝态氮含量变化动态

Table 7 Dynamics of nitrite-nitrogen and nitrate-nitrogen levels in culture solutions of isolated nitrococcus and nitrobacteria strains mg·L^{-1}

菌株号 Strain	指标 Index	培养时间 Incubation time (d)				
		0	1	3	5	7
A-4	亚硝态氮 Nitrite-nitrogen	0.000	0.182	0.392	0.429	0.518
	硝态氮 Nitrate-nitrogen	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
A-6	亚硝态氮 Nitrite-nitrogen	0.000	0.016	0.025	0.168	0.275
	硝态氮 Nitrate-nitrogen	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
A-8	亚硝态氮 Nitrite-nitrogen	0.000	0.000	0.026	0.041	0.062
	硝态氮 Nitrate-nitrogen	0.000	0.341	0.465	0.533	0.617
A-17	亚硝态氮 Nitrite-nitrogen	0.000	0.010	0.048	0.117	0.342
	硝态氮 Nitrate-nitrogen	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
X-4	亚硝态氮 Nitrite-nitrogen	0.000	0.006	0.011	0.052	0.121
	硝态氮 Nitrate-nitrogen	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

3 讨论与结论

对烤烟不同生长期土壤样品中各类型菌的数量分析结果表明：1)有机肥处理下烤烟旺长期土壤中各类菌数量高于成熟期土壤，这与前人的研究结果一致，烟株生长发育中期，腐殖酸可以增加细菌数量，但到中后期降低较快[8]。2)有机肥处理的土样中各类菌数量高于单施化肥处理。曹仕明等[9]研究结果表明，腐熟秸秆肥增加了土壤细菌、放线菌、硝化细菌和氨化细菌的数量，提高了土壤微生物种群的数量，明显改善了土壤生物特性。3)烤烟生长旺长期施用有机肥的土样中可培养细菌、真菌、放线菌、氨化菌数量均高于单施化肥处理，有研究表明将有机肥替代 30%化肥可显著增加玉米(*Zea mays* L.)拔节期细菌数量[10]，表明添施有机肥有利于提高作物旺长期土壤微生物活性；烤烟生长成熟期施用有机肥的土样中氨化菌、亚硝化菌、真菌、放线菌数量均高于单施化肥。土壤养分的转化与增加，主要是通过土壤中的生物活动来进行的[28]；有机氮的分解转化，主要是氨化菌、亚硝化菌、反硝化菌、固氮菌的作用，其中氨化菌、亚硝化菌对有机氮的分解起决定作用[16-18]。施用有机肥后，土壤根区微生物的活性较高，有机氮分解较快，烤烟成熟期有效态氮素处于较高水平[7]，因此研究氮素分解微生物有机肥，调控烤烟生长期有效态氮素释放速率对于烤烟生产有应用价值。

通过各类菌株的分离、纯化、鉴定，试验结果表明，氨化作用强度较高的优势菌株均来源于不同类型有机肥处理的土样，说明施用有机肥的植烟土壤能够获得较高活性的氨化细菌。对各类菌株代表的种属查阅相关文献分析其作用功能，可以确定 A-6、A-8、A-9、A-11、A-12、A-17、A-19、A-36、X-1、X-3、X-4 作为功能菌株进行氮素转化生物肥的配制后应用，其中的有效菌不会引起烟株及土壤病虫害。具体文献总结如下：国外利用洋葱伯克霍尔德菌等生防菌研制出各种防止农作物受霉菌类病

原菌侵害的生物农药[29-30]，但此菌也是囊性纤维化(CF)的主要病原菌[31]。寡养单胞菌属的许多菌株可以降解有机农药等多种有机物污染物，有些菌株还具有硝化反硝化、解磷聚磷等生物活性，有较强的生物修复功能，因此在环境保护中有着重要的研究价值[32]。嗜麦芽寡养单胞菌国外试用它作为生物防治制剂用于农业，但 2001 年 Singh 等[33]首次报道了该菌是印度水稻(*Oryza sativa*)一种新病“白纹病(White stripe)”的病原菌，目前已成为人类的一种重要的条件致病菌[34]。黄杆菌属广泛存在于水、土壤和植物中，该菌属不是人体的正常菌群，可以引起各种感染，甚至引起局部的暴发与流行[35]。何瑞[36]从土壤中筛选出 1 株可生物降解纤维素的纳西杆菌。本研究筛选的纳西杆菌属有待于鉴定其纤维素分解特性。芽孢杆菌种群庞大，繁殖能力强，耐热、耐酸碱、理化性质稳定，抑菌谱广泛，为目前主要的生防菌株[37-38]；巨大芽孢杆菌已经逐渐广泛地应用于解磷固氮、生物防治、畜牧养殖、水体净化、酶工程等方面[39-41]；戴玄等[42]研究证明嗜热脂肪芽孢杆菌 WF-146 是一株高产高温蛋白酶的优良菌株；短小芽孢杆菌不仅对降解垃圾有很好的效果，防治病虫害，还具有降解有机磷的能力，使得作物易于吸收土壤中的磷元素[43]。假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)[44]、肠杆菌属(*Ehterobacte* sp.)[45]和芽孢杆菌属[46]等均对拟除虫菊酯类农药具有降解作用。研究表明链霉菌 JD211 能促进一些稀有或生态势较弱的细菌生长，使参与土壤营养循环、改善土壤质地及防治植物病害的功能菌成为优势菌群[47]。涂国全等[48]研究表明，弗氏链霉菌对羽毛角蛋白有较强的分解利用能力。

研究者通常通过间接测定有机氮含量来说明氨化菌的氨化能力，即有机氮=总氮–氨氮–硝态氮–亚硝态氮[11-12]。本试验用牛肉膏蛋白胨液体培养基，氮素形态为有机氮，只适合氨化菌生长繁殖，理论上无亚硝化、硝化作用进行，在前人研究氨化细菌分解有机态氮素效果的基础上进行方法改进，直接测定液体培养基中凯氏氮及氨氮含量即可说明氨化菌氨化能力。研究表明凯氏氮含量降幅最大的为嗜热脂肪地芽孢杆菌培养液，短小芽孢杆菌、嗜热脂肪地芽孢杆菌、同温层芽孢杆菌培养液中有机氮含量降幅最大。李军冲等[12]研究氨化细菌在接种量为 2%，温度为 28 ℃，每天曝气时间为 6 h，pH 为 7.0 时对溶解性有机氮的分解能力最高，此时有机氮的分解率可达 90.6%。Zhang 等[13]从 BAF 反应器中分离出两株氨化菌 T1 和 Z1，在温度为 30 ℃，pH 为 7.0，接种量为 5%时两株菌对有机氮的转化率分别为 86.91%和 69.98%。进一步说明，在合适的条件下培养，通过有机氮降解率可以看出氨化菌的氨化能力，氨化作用较强的氨化菌为短小芽孢杆菌、嗜热脂肪地芽孢杆菌、同温层芽孢杆菌、高地芽孢杆菌、同温层芽孢杆菌、寡养单胞菌。通过分离出的亚硝化菌分解 NH^{4+}-N 试验得出，寡养单胞菌兼具有亚硝化作用及硝化作用；但嗜麦芽寡单胞菌为致病菌，因此，亚硝化、硝化作用较强的可以应用的菌株为纳西杆菌、纤维菌。根据分解有机氮、解氨试验及相关文献中各菌株作用功能分析，筛选出纳西杆菌、寡养单胞菌、短小芽孢杆菌、嗜热脂肪地芽孢杆菌、同温层芽孢杆菌、纤维菌、高地芽孢杆菌、同温层芽孢杆菌 8 株高效氮素功能菌株来进行有机氮分解微生物菌剂的配制。各类菌培养过程中，通过活性测定可以看出，氨化菌中芽孢杆菌在 48 h 后有机氮减少速率降慢，可能因为这些菌株将成熟、已成熟或已进入衰老阶段；氨化细菌生长较快，芽孢杆菌在合适培养基中 2 d 能产芽孢，达到成熟，培养时间长容易衰老、死亡；但亚硝化菌、硝化菌培养 1 周后活性仍很强，所以氨化菌、亚硝化菌、硝化菌配制解氮菌剂时，选定利于 3 种菌生长的培养基基础上，须先添加亚硝化菌、硝化菌，在发酵结束后前两天再添加氨化菌进行培养。

参考文献　References

[1] 刘国顺. 国内外烟叶质量差距分析和提高烟叶质量技术途径探讨[J]. 中国烟草学报, 2003, 9(S1): 54–58
Liu G S. Analysis of differences between domestic and overseas tobacco quality and technical approaches for the improvement of tobacco quality[J]. Acta Tabacaria Sinica, 2003, 9(S1): 54–58

[2] 夏振远, 李云华, 杨树军. 微生物菌肥对烤烟生产效应的研究[J]. 中国烟草科学, 2002, 23(3): 28–30
Xia Z Y, Li Y H, Yang S J. Effects of microbial fertilizer on flue-cured tobacco on field[J]. Chinese Tobacco Science, 2002, 23(3): 28–30

[3] 曹志洪. 优质烤烟生产的土壤与施肥[M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 1991
Cao Z H. Soil and Fertilizer of High Quality Flue-cured Tobacco Production[M]. Nanjing: Phoenix Science Press, 1991

[4] 丁美丽. 烟地土壤微生物特性与氮素生物有效性的关系[D]. 贵阳: 贵州大学, 2006: 5
Ding M L. Relation between the soil microbial characteristic and biological availability of nitrogen for tobacco, *Nicotiana tabacum* L. K326[D]. Guiyang: Guizhou University, 2006: 5

[5] 王忠华, 叶庆富, 舒庆尧, 等. 转基因植物根系分泌物对土壤微生态的影响[J]. 应用生态学报, 2002, 13(3): 373–375
Wang Z H, Ye Q F, Shu Q Y, et al. Impact of root exudates from transgenic plants on soil micro-ecosystems[J]. Chinese

Journal of Applied Ecology, 2002, 13(3): 373–375
[6] 张翼. 不同施肥措施对植烟土壤生化活性及烤烟产量品质的影响[D]. 武汉: 华中农业大学, 2013
Zhang Y. Effects of different fertilization on soil biochemical properties and the yield and quality of flue-cured tobacco[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2013
[7] 丁梦娇, 黄莺, 易维洁, 等. 施用有机肥对植烟土壤氮素转化与功能微生物的影响[J]. 西南农业学报, 2016, 29(5): 1166–1171
Ding M J, Huang Y, Yi W J, et al. Effects of applying organic manure on nitrogen transformation and functional microbes of tobacco-planting soil[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2016, 29(5): 1166–1171
[8] 彭智良, 黄元炯, 刘国顺, 等. 不同有机肥对烟田土壤微生物以及烟叶品质和产量的影响[J]. 中国烟草学报, 2009, 15(2): 41–45
Peng Z L, Huang Y J, Liu G S, et al. Effects of different organic fertilizer on soil microbe and hence quality and yield of tobacco leaves[J]. Acta Tabacaria Sinica, 2009, 15(2): 41–45
[9] 曹仕明, 廖浩, 张翼, 等. 施用腐熟秸秆肥对烤烟根系土壤微生物和酶活性的影响[J]. 中国烟草学报, 2014, 20(2): 75–79
Cao S M, Liao H, Zhang Y, et al. Effects of decayed straw manure on microbe and enzyme activities in soil around tobacco roots[J]. Acta Tabacaria Sinica, 2014, 20(2): 75–79
[10] 祝英, 王治业, 彭轶楠, 等. 有机肥替代部分化肥对土壤肥力和微生物特征的影响[J]. 土壤通报, 2015, 46(5): 1161–1167
Zhu Y, Wang Z Y, Peng Y N, et al. Changes of soil nutrients and microbial communities under the condition of organic fertilizers replacing part of chemical fertilizers[J]. Chinese Journal of Soil Science, 2015, 46(5): 1161–1167
[11] 刘秀. 有机氮分解菌的驯化筛选及其特性研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2012
Liu X. Isolation and characterization of organic nitrogen decomposing bacteria[D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2012
[12] 李军冲, 齐树亭, 石玉新, 等. 一株假单胞菌降解溶解有机氮条件探讨[J]. 食品研究与开发, 2010, 31(5): 151–153
Li J C, Qi S T, Shi Y X, et al. Research on conditions of degrading dissolved organic nitrogen by a *Pesudomonas*[J]. Food Research and Development, 2010, 31(5): 151–153
[13] Zhang W Y, Tan F Y, Zhao T T, et al. Isolation and identification of ammonibacteria and ammoniation characteristic analysis[J]. Advanced Materials Research, 2011, 340: 280–286
[14] 马骢毓, 张英, 马文彬, 等. 黄芪根际促生菌(PGPR)筛选与特性研究[J]. 草业学报, 2017, 26(1): 149–159
Ma C Y, Zhang Y, Ma W B, et al. Identification of plant growth promoting rhizobacteria *Astragalus membranaceus* and their effectives[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2017, 26(1): 149–159
[15] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 第 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2010: 39–114
Bao S D. Soil and Agricultural Chemistry Analysis[M]. 3rd ed. Beijing: China Agriculture Press, 2010: 39–114
[16] 姚槐应, 黄昌勇. 土壤微生物生态学及其实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 2006: 160–164
Yao H Y, Huang C Y. Soil Microbial Ecology and Its Experimental Techniques[M]. Beijing: Science Press, 2006: 160–164
[17] 林先贵. 土壤微生物研究原理与方法[M]. 北京: 高等教育出版社, 2010: 362–377
Lin X G. Principles and Methods of Soil Microbiology Research[M]. Beijing: Higher Education Press, 2010: 362–377
[18] 李振高, 骆永明, 滕应. 土壤与环境微生物研究法[M]. 北京: 科学出版社, 2008: 364–368
Li Z G, Luo Y M, Teng Y. Soil and Environmental Microbiology[M]. Beijing: Science Press, 2008: 364–368
[19] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 译. 北京: 科学出版社, 2002
Sambrook J J, Russell D W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. Huang P T, trans. Beijing: Science Press, 2002
[20] 国家环境保护总局, 水和废水监测分析方法编委会. 水和废水监测分析方法[M]. 第 4 版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002
State Environmental Protection Administration, Editorial Committee for Monitoring and Analysis of Water and Wastewater. Water and Wastewater Monitoring Analytic Method[M]. 4th ed. Beijing: China Environmental Science Press, 2002
[21] 丁梦娇. 植烟黄壤中氮代谢优势细菌的筛选及复合菌剂应用效果研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2016
Ding M J. The advantage of nitrogen metabolism bacteria screening and compound bacterium agent application effect in the plant tobacco yellow soil[D]. Guiyang: Guizhou University, 2016
[22] 习向银. 烟碱氮素来源和供氮对烤烟生长、氮素吸收、烟碱含量的影响[D]. 北京: 中国农业大学, 2005
Xi X Y. Sources of nicotine-N and effects of nitrogen supply on growth, nitrogen uptake, nicotine contents in *Nicotiaha tabacum* plants[D]. Beijing: China Agricultural University, 2005
[23] 张赫琼. 三唑酮等常用农药对稻田土壤真菌的群落效应及敏感性基线初探[D]. 杭州: 浙江大学, 2014
Zhang H Q. Study on the effect of pesticides such as triadimefon on paddy soil culturable fungal community and SSDs[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2014
[24] 周霞, 梁永江, 张长华, 等. 接种 AM 真菌对烤烟生长、营养及抗旱性的影响[J]. 华北农学报, 2012, 27(3): 181–185
Zhou X, Liang Y J, Zhang C H, et al. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on growth, nutrition and drought resistance of flue-cured tobacco seedlings[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2012, 27(3): 181–185
[25] 王芳, 图力古尔. 土壤真菌多样性研究进展[J]. 菌物研究, 2014, 12(3): 178–186
Wang F, Bau T. Research advances in the diversity of soil fungi[J]. Journal of Fungal Research, 2014, 12(3): 178–186
[26] Buchanan R E, Gibbons N E. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology[M]. 8th ed. Baltimore, Maryland: Williams & Wilkins, 1974: 520–521
[27] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001
Dong X Z, Cai M Y. Handbook of Common Bacterial System Identification[M]. Beijing: Science Press, 2001

[28] 孙曙光, 周建, 信培林, 等. 烟田土壤微生物与养分关系研究进展[J]. 江西农业学报, 2011, 23(7): 118–120
Sun S G, Zhou J, Xin P L, et al. Research progress in relationship between soil microorganisms and nutrients in tobacco field[J]. Acta Agriculturae Jiangxi, 2011, 23(7): 118–120
[29] Cartwright D K, Benson D M. *Pseudomonas cepacia* strain 5.5B and method of controlling *Rhizoctonia solani* therewith: US, WO1993US06196[P]. 1994-02-17
[30] Lacy D E, Spencer D A, Goldstein A, et al. Chronic granulomatous disease presenting in childhood with *Pseudomonas cepacia* septicaemia[J]. Journal of Infection, 1993, 27(3): 301–304
[31] 赵艳华. 洋葱伯克霍尔德菌研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(7): 651–652
Zhao Y H. Advances in the study of *Burkholderia cepacia*[J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2006, 27(7): 651–652
[32] 王昀璐, 花日茂, 唐欣昀. 寡养单胞菌在环境保护中的应用研究进展[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(28): 15796–15797
Wang Y L, Hua R M, Tang X Y. Application of *Stenotrophomonas* in environmental protection[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2010, 38(28): 15796–15797
[33] Singh N I, Swings I R J, Devi R K T, et al. White stripe, a new disease of rice caused by *Stenotrophomonas maltophilia* in India[J]. Indian Phytopathology, 2001, 54(2): 275–277
[34] 耿毅, 汪开毓, 陈德芳, 等. 嗜麦芽寡养单胞菌研究进展[J]. 动物医学进展, 2006, 27(5): 28–31
Geng Y, Wang K Y, Chen D F, et al. Progress on research of *Stenotrophomnas maltophilia*[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2006, 27(5): 28–31
[35] 田国忠. 产吲哚黄杆菌研究进展[J]. 中国病原生物学杂志, 2010, 5(2): 134–136
Tian G Z. Advances in the study of *Flavobacterium indologenes*[J]. Journal of Pathogen Biology, 2010, 5(2): 134–136
[36] 何瑞. 一株好氧性纳西杆菌(*Naxibacter* sp. SD-09)的产纤维素酶特性研究[D]. 长春: 东北师范大学, 2012
He R. Study on the cellulolytic characteristics of a aerobic *Naxibacter* sp. SD-09[D]. Changchun: Northeast Normal University, 2012
[37] 易龙, 张亚, 廖晓兰, 等. 蜡状芽孢杆菌次生代谢产物的研究进展[J]. 农药, 2013, 52(3): 162–164
Yi L, Zhang Y, Liao X L, et al. Advances in secondary metabolite produced by *Bacillus cereus*[J]. Agrochemicals, 2013, 52(3): 162–164
[38] 叶晶晶, 曹宁宁, 吴建梅, 等. 生防芽孢杆菌的应用研究进展[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2014, 42(8): 185–190
Ye J J, Cao N N, Wu J M, et al. Research progress on application of biocontrol *Bacillus*[J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition, 2014, 42(8): 185–190
[39] Vary P S, Biedendieck R, Fuerch T, et al. *Bacillus megaterium*—from simple soil bacterium to industrial protein production host[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 76(5): 957–967
[40] 吕黎, 王蕾, 周佳敏, 等. 巨大芽孢杆菌的研究现状及应用[J]. 农业科学研究, 2014, 35(3): 48–52
Lü L, Wang L, Zhou J M, et al. Research status and application of *Bacillus megaterium*[J]. Journal of Agricultural Sciences, 2014, 35(3): 48–52
[41] 王琳, 李季, 张鹏岩. 巨大芽孢杆菌对富营养化景观水体的净化效果[J]. 生态环境学报, 2009, 18(1): 75–78
Wang L, Li J, Zhang P Y. Laboratory study on treatment of eutrophicated scenery waterbody by *Bacillus megaterium*[J]. Ecology and Environmental Sciences, 2009, 18(1): 75–78
[42] 戴玄, 唐兵, 陈向东, 等. 产高温蛋白酶微生物菌种资源的研究[J]. 微生物学杂志, 1997, 17(3): 25–29
Dai X, Tang B, Chen X D, et al. Study on microbial strain resources for thermophilic protease production[J]. Journal of Microbiology, 1997, 17(3): 25–29
[43] 孔高飞. 一种短小芽孢杆菌分离鉴定及培养条件研究[D]. 杭州: 浙江理工大学, 2014
Kong G F. Isolation and identification of a *Bacillus pumilus* and optimization of its fermentation conditions[D]. Hangzhou: Zhejiang Sci-Tech University, 2014
[44] Zhang W J, Rui W Y, Tu C, et al. Responses of soil microbial community structure and diversity to agricultural deintensification[J]. Pedosphere, 2005, 15(4): 440–447
[45] 林淦. 阴沟肠杆菌 w10j15 中拟除虫菊酯类杀虫剂降解酶的酶学性质研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2004
Lin G. Studies on the characteristics of pyrethroids degrading enzyme from *Enterobacter cloacae* w10j15[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2004
[46] Maloney S E, Maule A, Smith A R W. Transformation of synthetic pyrethroid insecticides by a thermophilic *Bacillus* sp[J]. Archives of Microbiology, 1992, 158(4): 282–286
[47] 王世强, 魏赛金, 杨陶陶, 等. 链霉菌 JD211 对水稻幼苗促生作用及土壤细菌多样性的影响[J]. 土壤学报, 2015, 52(3): 673–681
Wang S Q, Wei S J, Yang T T, et al. Effect of *Streptomyces* JD211 promoting growth of rice seedlings and diversity of soil bacteria[J]. Acta Pedologica Sinica, 2015, 52(3): 673–681
[48] 涂国全, 于静. 一株分解羽毛角蛋白的弗氏链霉菌变种的初步鉴定[J]. 江西农业大学学报, 1994, 16(4): 399–403
Tu G Q, Yu J. The preliminary identification of a variation species of *Streptomyces fradiae* degrading feather-keratin[J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 1994, 16(4): 399–403